

Tartu Ülikool

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Greta Pentsa

**Tärglise modifitseerimisel kasutatava  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramine  
ning immobiliseerimine**

*Bakalaureusetöö keemia erialal (12EAP)*

Juhendaja: Toonika Rinken, PhD

Tartu 2016

## Sisukord

Sissejuhatus .....	3
1. Kirjanduse ülevaade .....	4
1.1. Kartulitärklise üldiseloostus ja tootmine .....	4
1.2. Modifitseeritud tärklis .....	5
1.2.1. Tärklise keemilise modifitseerimise meetodid .....	5
1.2.2. Modifitseeritud tärklise kasutamine.....	8
1.3. $\alpha$ -amülaasi iseloostus ja omadused.....	9
1.3.2. $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramise meetodid.....	10
1.4. Ensüümide immobiliseerimine .....	11
1.5. Toiduainetetööstuses ensüümide immobiliseerimiseks kasutatavad kandjad .....	12
2. Eksperimentaalne osa.....	13
2.1. Kasutatud seadmed .....	13
2.2. Kasutatud reaktiivid ja materjalid.....	13
2.3. $\alpha$ - amülaasi aktiivsuse määramine .....	13
2.3.2. Valgu määramine .....	14
2.3.3. $\alpha$ - amülaasi immobiliseerimine.....	14
3. Tulemused ja arutelu .....	16
3.1. Tingimuste optimeerimine $\alpha$ - amülaasi aktiivsuse määramiseks .....	16
3.2. Ensüümi aktiivsuse määramine ensüümi preparaadis .....	18
3.3. $\alpha$ - amülaasi immobiliseerimine nailon6,6 kandjale .....	19
3.3. Immobiliseeritud $\alpha$ -amülaasi stabiilsuse uurimine .....	20
Kokkuvõte .....	23
Kasutatud kirjandus.....	24

## Sissejuhatus

Eesti Vabariiki kutsuti 1920ndatel aastatel Kartuli Vabariigiks, sest siin kasvatati sellel ajal ühe elaniku kohta enim kartulit maailmas ning kartuli kasvatuse, töötlemise ja transpordiga seotud majandustegevused moodustasid tollase Eesti Vabariigi SKP-st 25-40%. Ehkki Eestis kasvatatakse palju kartulit ka praegu – 2013. aastal oli kartulisaak Eestis 128 tuhat tonni – siis näiteks tärklis ja modifitseeritud tärklis siin ei toodeta. Ometi kasutavad siinsed lihatööstused ja kommivabrik „Kalev“ oma toodangus modifitseeritud tärklis, mida imporditakse suures koguses välismaalt.

Tärklise modifitseerimisel kasutatakse ühe meetodina ensüümikatalüüsi. Tavaliselt lisatakse sel juhul tärklisele lahustunud ensüüme, mis jäävad seeläbi ka lõpptoodangusse, sest neid pole võimalik eraldada ega uuesti kasutada. Ensüümide kulu vähendamiseks on võimalik need immobiliseerida mittelahustuva tahkele kandjale, et neid saaks korduvalt kasutada.

Käesoleva töö eesmärgiks ongi uurida  $\alpha$ -amülaasi immobiliseerimise võimalusi nailon6,6 kandjale, immobiliseeritud ensüümi aktiivsust ja stabiilsust ning ühtlasi töötada välja usaldusväärne meetodika  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse iseloomustamiseks, mis võimaldaks määrata nii lahustunud kui ka immobiliseeritud ensüümi aktiivsust.

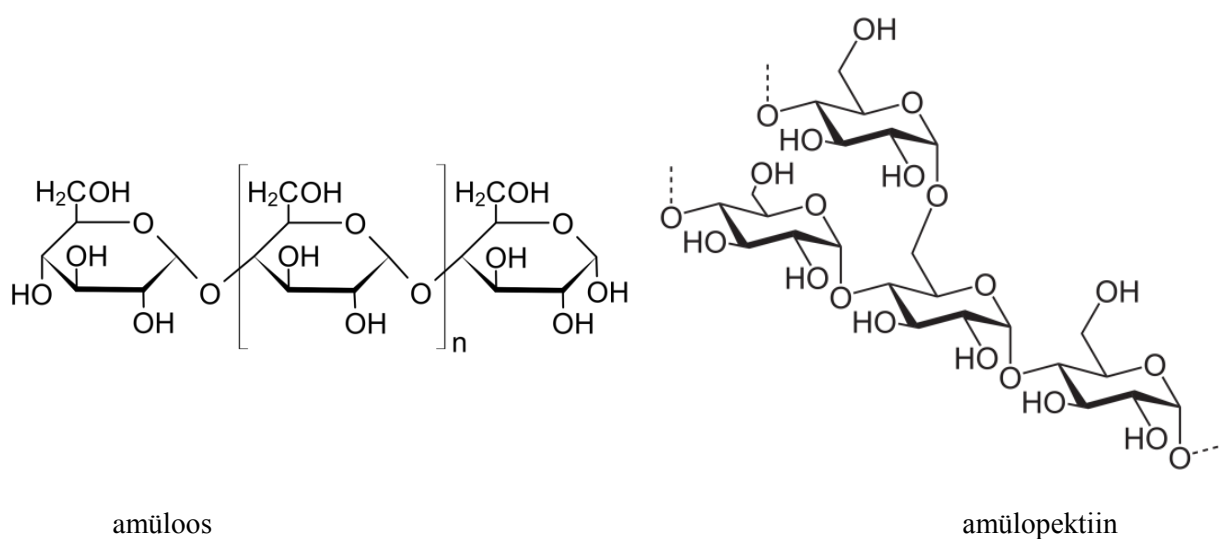
Töö teoreetilises osas antakse ülevaate erinevatest tärklise keemilise modifitseerimise võimalustest ning modifitseeritud tärklise rakendustest. Samuti sisaldub töös ülevaade  $\alpha$ -amülaasi omaduste ja ensüümi aktiivsuse määramise võimaluste kohta.

Töö praktilises osas leitakse optimaalsed tingimused  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks, teostatakse ensüümi immobiliseerimine, kus kandjana kasutatakse nailon6,6 niiti kui ka nailon6,6 graanuleid ning uuritakse immobiliseeritud ensüümi aktiivsust ja stabiilsust.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Kartulitärklise üldiseloostus ja tootmine

Kartulitärklis (edaspidi tärklis) (keemilise valemiga  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ) on polüsahhariid, mille monomeeriks on glükoos. Olenevalt sideme asukohast jagatakse tärklises olevaid polüsahhariide amüloosiks ja amülopektiiniks (joonis 1), mis hinnanguliselt moodustavad tärklisest vastavalt 20-25% ja 75-80% [1].



Joonis 1. Amüloosi ja amülopektiini struktuurid.

Amüloosis on glükoosijäägid seotud  $\alpha$ -1,4-glükosiidsidemetega, mis moodustavad 1000 kuni 6000 glükoosijäägist koosnevaid lineaarseid ahelaid. Amülopektiinis on iga kümne  $\alpha$ -1,4-sideme kohta üks  $\alpha$ -1,6-side, mida nimetatakse hargnemispunktiks. Amüloos ja amülopektiin moodustavad koos semikristallilise kihilise tärklise graanuli, mille suurus varieerub 5-100 mikromeetri vahel [1-2].

Kartul sisaldab tärklist 15-20% kogumassist. Kartulitärklise tootmine algab tooraine pesemisest ja puhastamisest. Seejärel kartulid purustatakse. Järgneb tsentrifuugimine, mille käigus eraldatakse segust kiud ja koored ning filtreerimine, mille abil eraldatakse tärklisest mittesooitud lisandid. Saadud filtraati pestakse veel. Seejärel tärklis kuivatatakse ning pakendatakse [3].

Tärklis on valge, lõhnatu ja külmas vees praktiliselt lahustumatu pulber. Tärklise lahustumine vees on ülimalt väike – olenevalt päritolust 0,102-0,192% [4].

Üheks tärklise oluliseks omaduseks on tema geelistumisvõime. Vee ja kuumuse (54-75°C) mõjul hakkab tärklisegraanul paisuma, misjuures lõhutakse molekulisidemeid vesiniksidemeid. Lahuse jahtumisel moodustub elastne ja kõrge viskoossusega geel. Tärklise geelistumisvõime on olenevalt päritolust 58-70 g/g [4, 5-6]

Retrogradatsioon on geelistumise pöördreaktsioon, mis toimub kuumutatud tärklise jahtumisel, kui molekulid ennast lahuses ümber paigutavad ning vesiniksidemed moodustavad. Ometi pole kartulitärklis kuigi aldis retrogradateeruma. Peale 120 tundi seismist retrogradateerub vaid 11-14% tärklisest [4].

Tärklis on stabiilne kõrgetel pH-del, kuid hüdroolüüsuvad madalatel pH-del. Tärklis pole vastupidav madalatel temperatuuridel. Tärklise geelistumistemperatuuri, viskoossuse, lahustuvuse, stabiilsuse ja vastupidavuse madalatele temperatuuridele ja kõrgetele pH-dele parandamiseks või esiletoomiseks seda modifitseeritakse [1, 5-6].

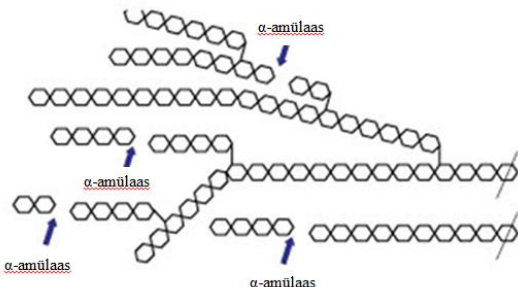
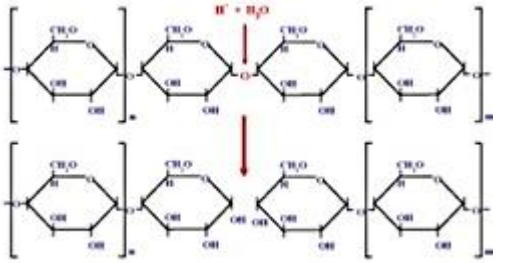
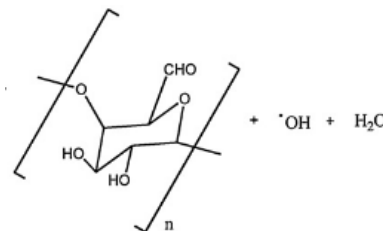
## **1.2. Modifitseeritud tärklis**

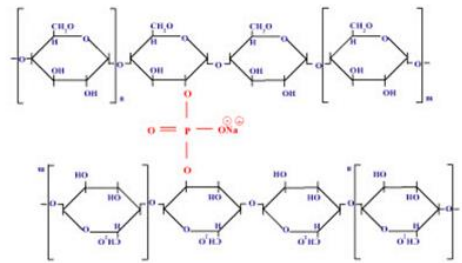
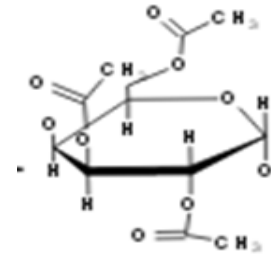
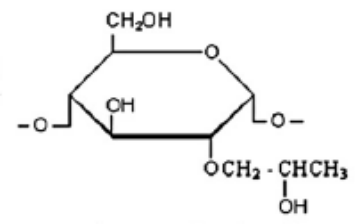
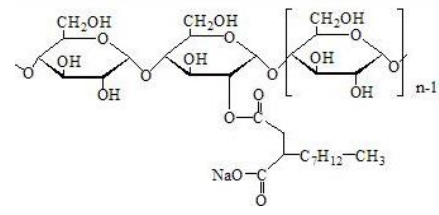
Tärklise modifitseerimiseks töödeldakse seda keemiliselt (alused, happed, soolad), füüsikaliselt või ensümaatilist. Tärklis modifitseeritakse selleks, et suurendada selle lahustuvust, stabiilsust ja vastupidavust madalatele temperatuuridele ja kõrgetele pH-dele. Samuti modifitseeritakse tärklis selleks, et suurendada või vähendada viskoossust ja geelistumistemperatuuri ning muuta tärklise tekstuuri [5-6].

### **1.2.1. Tärklise keemilise modifitseerimise meetodid**

Tärklise modifitseerimiseks on mitmeid erinevaid meetodeid. Tärklise keemilise modifitseerimise käigus lisatakse molekulile juurde funktsionaalrühmi või lõhutakse tärklise molekulis olevaid glükosiidsidemed. Ülevaade tärklise keemilise modifitseerimise meetoditest ja saadavatest produktidest on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Tärklise keemilise modifitseerimise meetodid.

	Meetod	Kasutatavad reagentid	Omaduste muutumine	Modifitseeritud tärklis	Viide
1.	Hüdrolüüs	$\alpha$ -amülaas	Väheneb tärklise viskoossus Suureneb tärklise lahustuvus vees		[1, 7-9]
2.	Töötlemine happega	Soolhape, fosforhape, metaanhape, etaanhape, propanhape, oktadekaanhape	Suureneb tärklise viskoossus Suureneb tärklise lahustuvus vees		[9-10]
3.	Oksüdeerimine	Vesinikperoksiid	Väheneb viskoossus Suureneb vastupidavus madalatel temperatuuridel Toimib tärklise valgendajana		[8, 11]

4.	Fosforüleerimine	Naatriumortofosfaat, naatriumheksametafosfaat, fosfor oksükloriid	Suureneb vastupidavus kõrgetel temperatuuridel Suureneb vastupidavus madalatel pH-del Suureneb viskoossus Suureneb stabiilsus		[8-9, 12]
5.	Atsetüülimine	Atseeetanhüdiid	Alaneb tärglise geelistumistemperatuur Suureneb stabiilsus kuumuse ja hapete suhtes Suureneb tärglise lahustuvus vees		[8, 13]
6.	Hüdroksüpropüleerimine	Propüleenoksiid	Suureneb liikumisvabadus Suureneb lahustuvus külmas vees Suureneb viskoossus Suureneb külmutamis-sulatamis stabiilsus Alaneb geelistumistemperatuur		[8, 12]
7.	Suktsinüülimine	Suktsinaadid	Alaneb geelistumistemperatuur Suureneb stabiilsus madalatel temperatuuridel Suureneb vastupidavus tugevate hapete suhtes.		[8, 14-15]

### 1.2.2. Modifitseeritud tärglise kasutamine

Modifitseeritud tärglise kasutusala on väga varieeruvad. See leiab väga laialdast kasutamist toiduaine- ja paberitööstuses, kuid ka ravimi-, kosmeetika-, tubaka- ja tekstiilitööstuses, liimides ja loomasöötades [16].

#### 1.2.2.1. Toiduainetööstus

Kõige laialdasemalt kasutatakse modifitseeritud tärglist toiduainetööstuses. Modifitseeritud tärglise vorme tähistatakse toiduainete pakenditel koodidega E1400–E1450 [17-18]. Tabelis 2 on toodud erinevate modifitseeritud tärgliste kasutusala.

Tabel 2. Modifitseeritud tärgliste omadused ja kasutusala toiduainetööstuses.

	<b>Nimetus</b>	<b>Kasutamise eesmärk</b>	<b>Kasutusala</b>	<b>Viide</b>
E1400	Dekstriinid	Paksendaja, sideaine, stabilisaator	Küpsetised, maiustused	[8,18]
E1401	Happega töödeldud tärglis	Paksendaja, sideaine, stabilisaator	Küpsetised, piimatooted	[8, 18-19]
E1404	Oksüdeeritud tärglis	Emulgaator, sideaine, stabilisaator	Küpsetised, piimatooted	[8, 18-20]
E1405	Ensüümiga töödeldud tärglis	Paksendaja	Maiustused	[18]
E1412	Ditärglis fosfaat	Paksendaja, sideaine, stabilisaator	Küpsetised, piimatooted, supid, kastmed	[8, 18-19]
E1420	Atsetüleeritud tärglis	Paksendaja, stabilisaator	Külmutatud toidud	[8, 18]
E1422	Atsetüleeritud ditärglis adipaat	Paksendaja, sideaine, stabilisaator	Külmutatud toidud	[8, 18]
E1440	Hüdroksüprolüleeritud tärglis	Paksendaja, emulgaator, sideaine	Kastmed, pudingud	[8, 18]
E1442	Hüdroksüprolüleeritud ditärglis fosfaat	Stabilisaator, paksendaja	Lihatooted, küpsetised	[18]
E1450	Naatriumoktenüülsuktsinaat-tärglis	Emulgaator, stabilisaator, sideaine, paksendaja	Kastmed, piimatooted	[15, 18, 20]



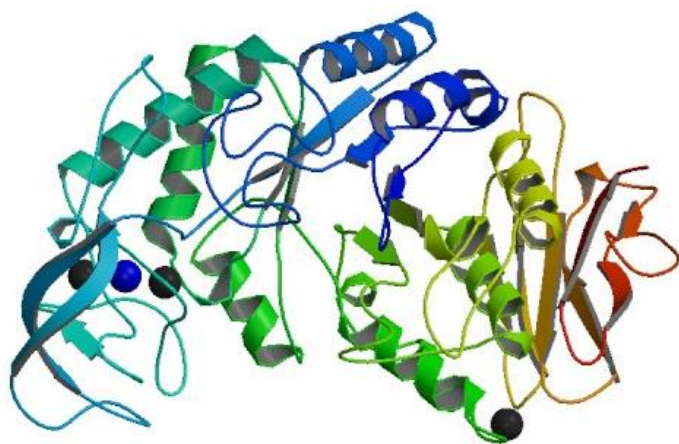
#### 1.2.2.2. Paberitööstus

Modifitseeritud tärklis kasutatakse sideainena laialdaselt paberitööstuses, sest see on suhteliselt odav ning annab paberile tugevama ja ühtlasema struktuuri. Paberitööstus saab kartulist umbes 15% vajaminevast tärklisest. Erinevates paberitööstustes üle maailma kasutatakse praegu umbes 5 miljonit tonni tärklis aastas, seega kartulitärklis umbes 750 000 tonni [21-22].

Paberitööstuses kasutatakse oksüdeeritud, hüdroksüpropüleeritud ja suksinaadiga töödeldud tärklis [22-23].

### 1.3. $\alpha$ -amülaasi iseloomustus ja omadused

$\alpha$ -amülaas (EC 3.2.1.1) on hüdrolaaside klassi kuuluv ensüüm, mis hüdrolüüsib 1,4- $\alpha$ -glükosiidsidemeid tärklises, glükogeenis ja teistes sarnastes polüsahariidides ning seda leidub taimedes, loomades ja mikroorganismides (joonis 2). Kõige enam toodetakse  $\alpha$ -amülaasi mikroorganismidest, sest nende kasv ja paljunemine on kiire ning nendega on kergem tegeleda, kui loomade ja taimedega, mis omakorda kiirendab ka ensüümi tootmise protsessi [29].



Joonis 2. *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amülaas.

Ensüüm sai oma nime 1925. aastal, kui avastati, et tema hüdroolüüsiproduktid on alfa konfiguratsioonis.  $\alpha$ -amülaasi leidub inimese süljes ning pankreases, kuid vähemal määral ka munasarjades, kopsudes, vöotlihastes ja rasvkoes. Tärglise hüdroolüüsi tulemusel tekib glükoos, maltoos või dekstriinid [24-28].

Ensüüm koosneb 483st aminohappe jäägist [30] ja selle molekulmass on ligikaudu 62 kDa [31]. Negatiivselt laetud aminohappejääke (aspartaat ja glutamaat) on molekulis 62, positiivselt laetuid (arginiin, histidiin ja lüsiin) 74 ja aromaatsaid (türosiin, fenoolalaniin, trüptofaan) 67. Ülejäänud aminohappejäägid on neutraalse laenguga, kusjuures tsüsteiin on ainus aminohape, mis pole  $\alpha$ -amülaasis esindatud [30].

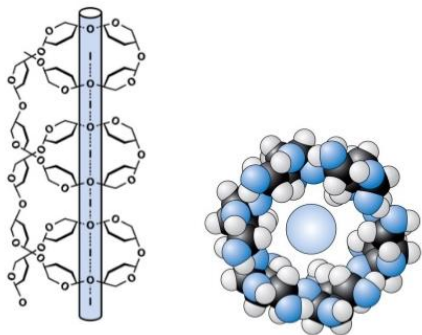
$\alpha$ -amülaasile toimivad inhibiitoritena  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ja  $Fe^{2+}$  ioonid, samuti kõrgel temperatuuril (90°C) EDTA [31, 34].

### 1.3.2. $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramise meetodid

Ensüümide juures on kõige olulisemaks näitajaks ensüümi aktiivsus. Ensüümi aktiivsus on defineeritud kui ensüümi hulk, mis produtseerib 1 mikromooli produkti minutis standardtingimustel.  $\alpha$ -amülaasi aktiivsus on defineeritud kui ensüümi hulk, mida on vaja, et hüdroolüüsida 0,1mg tärglist ühes minutis või ensüümi hulk, mis vabastab 1 mikromooli glükoosi minutis [31-32].

Kirjanduse põhjal on  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramise põhimõttelisi võimalusi neli:

(1) Meetod põhineb tärglis-jood kompleksi (joonis 3) tekkimisel – mida intensiivsem on kompleksi sinine värvus, seda rohkem on proovis tärglist. Moodustunud kompleksi neelduvust mõõdetakse lainepikkusel 580nm. Proovi lisatakse ensüümi, tärglist ja puhverlahust, seejärel inkubeeritakse segu ning ensümaatilise reaktsiooni lõpetamiseks lisatakse hapet, seejärel joodi reagenti ning allesjääv tärglis määratakse spektrofotomeetriga lahuse neelduvust mõõtes. Meetod on leidnud väga laialdast kasutamist. Määramise tingimused on erinevates teadusartiklites varieeruvad. Lisatava ensüümi kogus kõikus 0,1-2,5ml vahel; inkubeerimisaeg jäi vahemikku 5 kuni 60 minutit, inkubeerimistemperatuur 37°C kuni 96°C; happena kasutati erinevate allikate põhjal soolhapet või etaanhapet [24, 26, 32-34].



Joonis 3. Tärklis-jood kompleks.

(2) Mõõdetakse vabanenud glükoosi hulka. See meetod põhineb Somogyi-Nelson meetodil, mis töötati välja juba 1944. aastal, kuid mida kasutatakse siiani väga laialdaselt. Proovile lisatakse 2 ml vaske sisaldavat reagenti ( $15\% \text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , paar tilka  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ning kuumutatakse 20 minutit veevannil  $100^\circ\text{C}$  juures. Seejärel proov jahutatakse ning sellele lisatakse 2ml arseenmolübitaadi reagenti ( $5,5\% (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , konts.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $12\% \text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), misjärel mõõdetakse segu neelduvust  $660\text{nm}$  juures [35-36].

(3) Dinitrosalitsüülhappe (DNS) meetod, kus tärklise ja ensüümi segu inkubeeritakse 10 minutit  $50^\circ\text{C}$  juures ning lisatakse seejärel DNS reagenti. Segu inkubeeritakse keeval veevannil 5 minutit ning jahutatakse toatemperatuurini. Segu neelduvus mõõdetakse  $540\text{nm}$  juures ning tulemus lahutatakse segu neelduvusest, kuhu pole ensüümi lisatud [29].

(4) *Falling Number* (FN) test. Hinnatakse tärklise viskoossuse muutumist. Tärklis vees ei lahustu, vaid moodustab veega segades ja kuumutamisel kõrge viskoossusega segu. Lisades segusse  $\alpha$ -amülaasi, hakkab segu viskoossus vähenema. Mida väiksem on tärkliselahuse viskoossus, seda suurem on ensüümi aktiivsus [29].

#### 1.4. Ensüümide immobiliseerimine

Lahustunud ensüümi kasutamine tähendab, et seda saab teha vaid ühekordselt. Ensüümid jäävad lõpptoodangusse ja neid pole võimalik sealt eemaldada. Alternatiiviks on ensüümi immobiliseerimine tahkele kandjale, mis tähendab, et seda saab kasutada korduvalt.

Ensüümide immobiliseerimiseks kasutatakse füüsikalist adsorptsiooni ning ioonilist- ja kovalentset sidumist. Füüsikaline adsorptsioon on lihtne ja odav meetod, kuid selle puuduseks on ensüümi nõrk seotus kandjaga. Ensüüm on kandjale seotud peamiselt vesiniksidemete ja Van der Waalsi jõududega [40-41].

Iooniliseks sidumiseks kasutatakse polüsahhariide ja sünteetilisi polümeere, sest need sisaldavad endas ioon-vahetus tsentreid. Kuna iooniline sidumine muudab pisut ensüümi aktiivtsentri konfirmatsiooni, kaasneb ioonilise sidumisega märgatav ensüümi aktiivsuse langus [40-41].

Kovalentne sidumine ei too endaga kaasa mitte mingeid muutusi ensüümi aktiivtsentri konformatsioonis ning seetõttu ei mõjuta immobiliseerimine oluliselt ensüümi aktiivsust. Kovalentsel sidumisel on üheks võimaluseks nailon6,6 kandja kasutamine [37, 40-41].

### **1.5. Toiduainetetööstuses ensüümide immobiliseerimiseks kasutatavad kandjad**

Kandja mängib ensüümi immobiliseerimise juures olulist rolli. Toiduainetetööstuses ensüümide immobiliseerimiseks sobiv kandja peaks olema odav, et protsess ennast ära tasuks; suure pinnaga, et sinna võimalikult palju ensüümi mahuks; toiduainetes inertne, et ei toimuks leostumist. Samuti peaks kandjale sidumine muutma võimalikult vähe ensüümi konformatsiooni [42].

Immobiliseerimisel kasutatakse mittelahustuvate kandjatena tihti biopolümeere nagu tselluloos, agaroos, kollageen ja kaltsium alginaat; sünteetilisi polümeere nagu emeraldiin (polüaniliin) ja nailon6,6 ning anorgaanilisi materjale nagu klaas ja silikageel [41].

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Kasutatud seadmed

pH meeter Mettler Toledo ( $\pm 0,01$  pH ühikut)

Magnetsegaja MS3000 (Biosan)

Analüütiline kaal PB602-S/FACT (Mettler Toledo) (täpsus 0,01 mg)

UV spektrofotomeeter UV-1800 (Shimadzu)

Termostaat Sky Line TW2.03 (ELMI)

### 2.2. Kasutatud reaktiivid ja materjalid

Kaaliumdivesinikfosfaat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (AppliChem, min 95,5%)

Kaaliumhüdrosiid (KOH) (AppliChem, min 85%)

Ökotärklis (Finnamyl OY)

$\alpha$ -amülaas (Brennzyme HL120L)

Kaaliumjodiid (KI) (Реахим)

Jood ( $\text{I}_2$ ) (Реахим)

Etaanhape ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Реахим)

Dimetüülsulfaat ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_4\text{S}$ ) (Sigma Aldrich, min 99%)

Glutaaraldehüüd ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) (Scharlau, extra pure)

Metanool ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Naxo, analytical grade)

Nailon6,6 niit (Oja, Türgi)

Nailon6,6 graanulid (Sigma Aldrich)

### 2.3. $\alpha$ - amülaasi aktiivsuse määramine

$\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks kasutati tärklise ja joodi reaktsiooni, hinnates allesjäänud tärklise kogust.

Omavahel segati 1ml ensüümi, 1ml 2%-list tärklise lahust ja 1ml 0,1M fosfaatpuhverlahust. Kontrollseguisse lisati 1ml 2%-list tärklise lahust ja 2ml puhverlahust.

Seejärel inkubeeriti reaktsioonisegusid ning ensümaatilise reaktsiooni lõpetamiseks lisati 2,5ml 0,1M etaanhapet. Segudele lisati joodi reagenti (0,2% jood ja 2% KI) ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Seejärel mõõdeti segu neelduvust 580nm juures.

Ensüümi aktiivsus arvutati valemist

$$U/ml = \frac{A(\text{kontroll}) - A(\text{proof})}{0,1\text{mg tärklise A} \cdot \text{aeg (min)} \cdot \text{ensüümi kogus (ml)}} \quad (\text{valem 1}),$$

kus A on neelduvus [39].

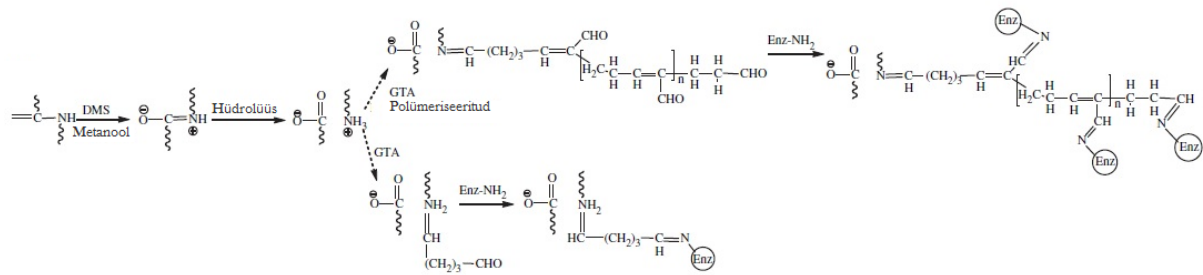
Mõõtmiseks kasutati UV Kvarts (0,350ml) küvette. Kõikidele mõõtmistele viidi läbi 3 kordusmõõtmist.

### 2.3.2. Valgu määramine

Valgu määramiseks  $\alpha$ -amülaasi vesilahuses lahjendati ensüümilahust fosfaatpuhverlahusega (0,1M, pH=7) 100, 500, 1000 ja 10 000 korda. Lahuste neelduvust iseloomustati lainepikkusel 280nm. Valgusisalduse määramiseks lahuses kasutati K. Kivirand'i poolt PSA baasil koostatud kalibreerimisgraafikut.

### 2.3.3. $\alpha$ - amülaasi immobiliseerimine

$\alpha$ -amülaasi immobiliseerimiseks nailon6,6 kandjale kasutati varem välja töötatud metoodikat, kus kandjat töödeldi 40°C dimetüülsulfaadiga 40 sekundit ja pesti kaks korda jääkülma metanooliga ning mitmeid kordi 0,1M puhverlahusega (pH=7). Seejärel töödeldi kandjat 60 minutit toatemperatuuril 12,5%-lise glutaaraldehüüdiga 0,1M fosfaatpuhveris (pH=7). Viimaks pesti kandjat mitmeid kordi fosfaatpuhvriga. Aktiveeritud nailon6,6 jäeti 4°C juures 24 tunniks 20ml 100%-lisse ensüümilahusesse seisma ning seejärel pesti mitmeid kordi fosfaatpuhvriga. Immobiliseerimisprotsessi kokkuvõttev skeem on toodud joonisel 4 [37].



Joonis 4. Ensüümi immobiliseerimine nailon 6,6-le.

Nailon6,6 niit oli immobiliseerimisprotsessi ajal keritud teflonalusele ning see lihtsustas materjali kasutamist erinevates immobiliseerimise etappides. Graanulid seevastu olid sidumata ja oma naturaalses olekus, mis muutis nende kasutamise immobiliseerimise ajal keerulisemaks kui niidi puhul.

Nailon6,6 niidi pikkuseks oli 1m ja graanulite massiks  $0,3326 \pm 0,0200$ g.

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. Tingimuste optimeerimine $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks

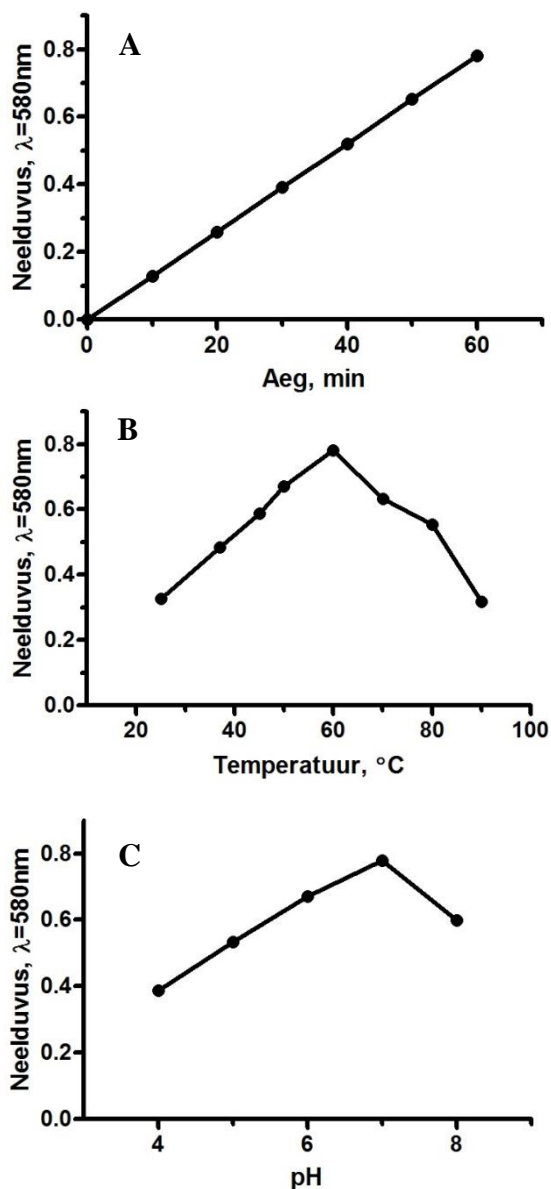
$\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks valitud metoodika põhineb kahe reaktsioonisegu neelduvuste võrdlemisel. Ühte segusse on ensüümi lisatud (proov), teise mitte (kontroll). Kontrollproovi alusel on võimalik arvutada, kui palju tärklist ensümaatilise reaktsiooni lõppedes proovi alles jäi ning selle põhjal arvutada ensüümi aktiivsus.

Kasutatavad reagentid ja lahused olid lihtsad ning metoodika ise sealjuures täpne ning laialdast kasutamist leidnud [38, 24, 26, 32-34]. Teised aktiivsuse määramise meetodid on leidnud vähem kasutamist või on kasutatavad reaktiivid neis pidevaks kasutamiseks keerulisemad valmistada.

Kuna kirjanduses toodud tingimused sel meetodil  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks erinevad üksteisest oluliselt inkubeerimisaja, temperatuuri ja lahuse pH poolest [24, 26, 32-34], siis uuriti esmalt nende parameetrite muutumise mõju mõõdetavale signaalile (lahuse neelduvus 580nm juures). Kuna varieerusid ka lahuste kogused ja kontsentratsioonid, valiti töös kasutatavasse metoodikasse kirjanduses enim esinenud kontsentratsioonid ja kogused.

60°C juures inkubeeriti reaktsioonisegu 10 kuni 60 minutit (joonis 5A). Kuna inkubeerimisaja pikenedes suureneb mõõdetav signaal lineaarselt, leiti, et edaspidisteks katsetes on sobivaim inkubeerida reaktsioonisegu 60 minutit. Reaktsioonisegu inkubeerimine pikema aja vältel oleks olnud ebaotstarbekas, sest see võtab liialt palju aega ning kirjanduse andmetel hakkab signaal pikema aja jooksul vaikselt kahanema [33-34].





Joonis 5. Tingimuste optimeerimine  $\alpha$ - amülaasi aktiivsuse määramiseks – (A) inkubeerimisaja mõju ( $t=60^\circ\text{C}$ , 0,1M fosfaatpuhver, pH=7,0), (B) pH mõju ( $t=60^\circ\text{C}$ , 0,1M fosfaatpuhver, 60 minutit) ja (C) temperatuuri mõju (0,1M fosfaatpuhver, pH=7,0, inkubeerimisaeg 60 minutit).

Temperatuuri mõju mõõdetavale signaalile määrati 60 minutilise inkubeerimisega pH 7,0 juures vahemikus  $25^\circ\text{C}$  -  $90^\circ\text{C}$ . Selgus, et suurim mõõdetav signaal saadi temperatuuril  $60^\circ\text{C}$ . Juba  $70^\circ\text{C}$  juures oli märgata olulist mõõdetava signaali vähenemist. Madalamatel ja kõrgematel temperatuuridel oli mõõdetav neelduvus isegi kuni 2,5 korda väiksem (joonis 5B).

Lahuse pH mõju signaalile uuriti reaktsioonisegu inkubeerimisel  $60^\circ\text{C}$  juures 60 minutit pH vahemikus 4,0 kuni 8,0 (joonis 5C). Saadud tulemuste alusel leiti, et edasisteks mõõtmisteks on sobivaim pH=7,0. Võrreldes kirjanduses tooduga, kus ensüümi aktiivsuse

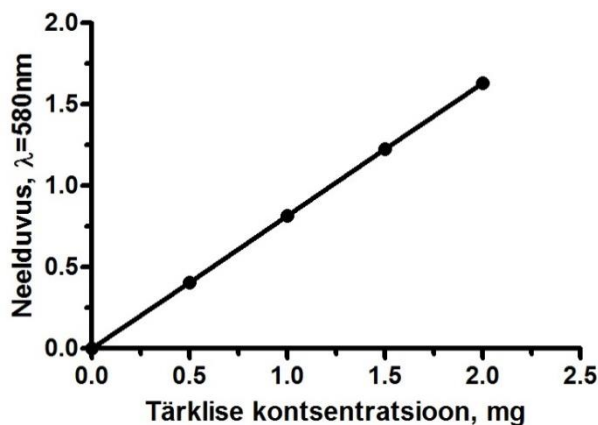
maksimum on vahemikus pH=7-8 [34], oli ensüümi aktiivsuse maksimum teravam ning sellest kõrgemal lahuse pH väärtusel hakkas ensüümi aktiivsus vähenema.

Ensüümi aktiivsuse määramise tingimuste optimeerimise käigus leiti, et uuritava  $\alpha$ -amülaasi aktiivsust on kõige ratsionaalsem määrata inkubeerimisel 60°C juures 60 minutit, kui reaktsioonisegu pH on 7,0. Nimetatud tingimusi kasutati nii lahustunud kui ka immobiliseeritud  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks.

### 3.2. Ensüümi aktiivsuse määramine ensüümi preparaadis

Valgu kontsentratsioon ensüümilahuses määrati punktis 2.3.2. kirjeldatud meetodil. Leiti, et kasutatud kommertsiaalses  $\alpha$ -amülaasi lahuses on valgu kontsentratsioon 0,284mg/ml.

$\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks koostati esmalt kalibreerimisgraafik lahuses oleva tärklise määramiseks tärklis-jood kompleksi neelduvuse alusel lainepikkusel 580nm (joonis 6).



Joonis 6. Tärklise neelduvuse sõltuvus kontsentratsioonist. Erinevate tärklise kontsentratsioonide neelduvust mõõdeti lainepikkusel 580nm. Mõõtmised viidi läbi 0,1M fosfaatpuhvril (pH=7,0) ja toatemperatuuril.

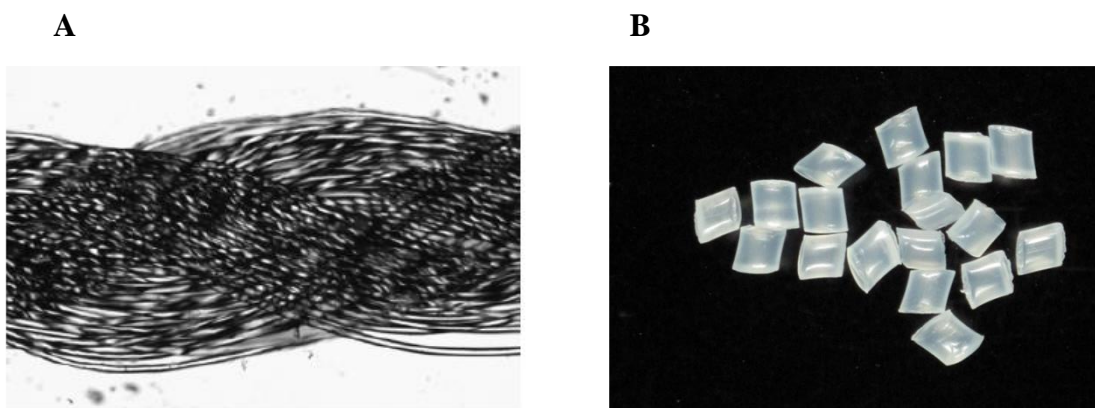
Saadud graafikut kasutati  $\alpha$ -amülaasi poolt lagundatud tärglase koguse määramiseks erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel. Kasutades valemit 1, saadi  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuseks kasutatud preparaadis  $0,17 \pm 0,03 \text{ U/ml}$  ehk  $0,61 \pm 0,03 \text{ U/mg}$ .

Lahustunud ensüümpreparaat oli stabiilne ja selle aktiivsus  $4^\circ\text{C}$  juures ei muutunud 1 aasta vältel. Toiduainetetööstuses tarnitaksegi  $\alpha$ -amülaasi lahusena, mille säilivusaeg on tavapäraselt kuus kuud kuni aasta. Peale säilivusaja lõppu säilitab ensüüm 95% oma esialgsest aktiivsusest ning iga järgneva kuu jooksul langeb aktiivsus 1-2% [43-44].

### 3.3. $\alpha$ - amülaasi immobiliseerimine nailon6,6 kandjale

$\alpha$ -amülaas immobiliseerimiseks kasutati kandjana nii nailon6,6 niiti kui nailon6,6 graanuleid.

Nailonniit koosnes 60 kiust, mille läbimõõt oli  $25\mu\text{m}$  (joonis 7A). Nailongraanulid olid läbimõõduga 5mm (joonis 7B) [45]. Kandjate iseloomustamiseks leiti nende ligikaudne eripind 1g kohta. Niidi ja graanulite jaoks oli see vastavalt  $0,5760 \text{ m}^2/\text{g}$  ja  $0,00702 \text{ m}^2/\text{g}$ , st. niidi eripind on ligikaudu 80 korda suurem kui graanulitel.



Joonis 7. Nailon6,6 niit (A) ja nailon6,6 graanulid (B) mikroskoobi all. Nailon6,6 niit koosneb 60 kiust, mille läbimõõt on  $25\mu\text{m}$ . Nailon6,6 graanulite läbimõõt on 5mm.

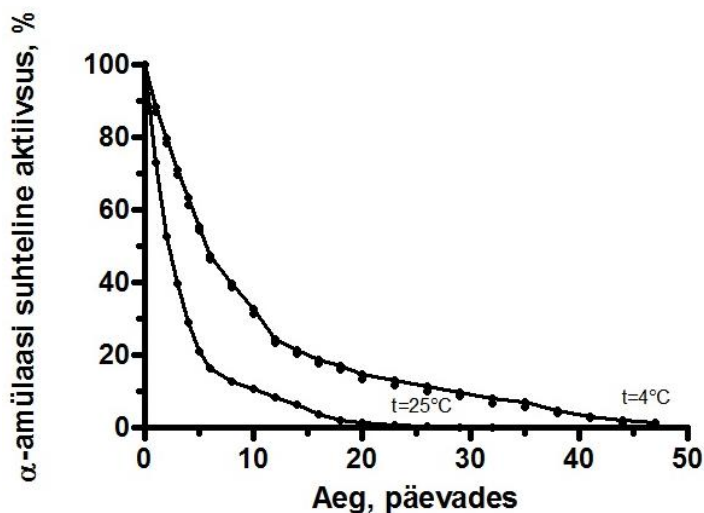
Värskelt immobiliseeritud ensüümi aktiivsus oli niidi puhul  $0,55 \pm 0,02 \text{ U/mg}$  ehk  $0,0000618 \pm 0,00002 \text{ U/mm}^2$  ning graanulite korral  $0,0048 \pm 0,002 \text{ U/mg}$  ehk

$0,0000467 \pm 0,00002 \text{ U/mm}^2$ . Olgugi, et niidile immobiliseeritud ensüümi aktiivsus oli suurem, on aktiivsused pinnaühiku kohta võrreldavad, sest niidi pind on 80 korda suurem kui graanulitel.

Võrreldes ensüümi immobiliseerimist erineva kujuga kandjatele selgus, et on oluline leida lihtne võimalus kandjate pesemiseks ning ühest lahusest teise viimiseks, sest graanuleid oli lahustest keeruline eraldada ja pesta. Lisaks kleepus osa graanuleid ka kokku ning seeläbi sai kandja kahjustada, mis samuti võis mõjutada immobiliseerimise lõpptulemust. Niidi puhul probleemi ei olnud, sest see oli keritud inertsele alusele.

### 3.3. Immobiliseeritud $\alpha$ -amülaasi stabiilsuse uurimine

Kandjale immobiliseeritud  $\alpha$ -amülaasi stabiilsust uuriti nii  $4^\circ\text{C}$  juures kui toatemperatuuril: niidikujulise kandja korral on aktiivsuse muutus seismisel ja kasutamisel toodud joonisel 8. Saadud sõltuvuse alusel leiti inaktivatsiooni poolestusaeg: see oli  $4^\circ\text{C}$  juures  $5,965 \pm 0,003$  päeva ja toatemperatuuril  $25^\circ\text{C}$  juures  $2,220 \pm 0,005$  päeva.

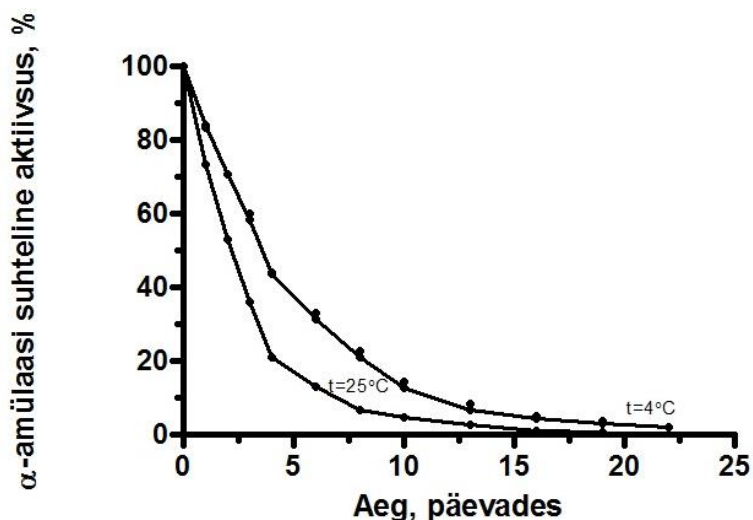


Joonis 8. Nailon6,6 niidile immobiliseeritud  $\alpha$ -amülaasi inaktiveerumine. Niite hoiustati  $4^\circ\text{C}$  juures ja toatemperatuuril 0,1M fosfaatpuhvril ( $\text{pH}=7$ ).

Nailon6,6 graanulitele immobiliseeritud  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse muutus on toodud joonisel 9. Graanulitele immobiliseeritud ensüümi inaktivatsiooni poolestusaeg oli  $4^\circ\text{C}$  juures

$4,248 \pm 0,005$  päeva ja toatemperatuuril  $2,102 \pm 0,005$  päeva. Võrreldes niidile immobiliseeritud ensüümiga oli graanulite inaktivatsiooni poolestusaeg lühem.

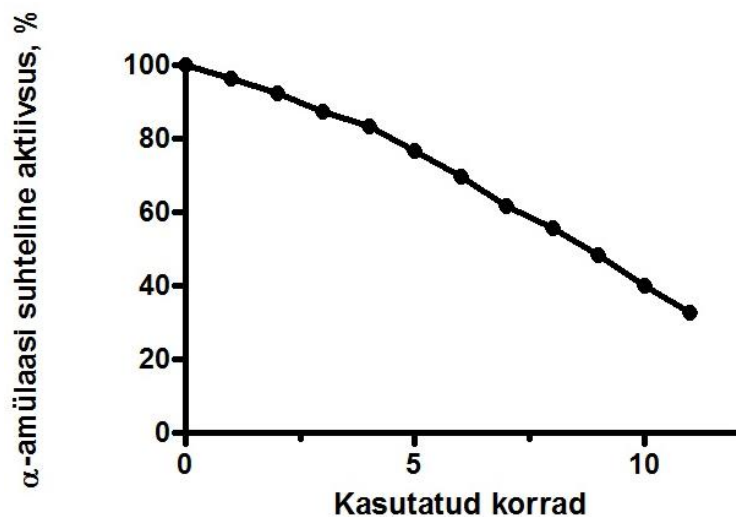
Selline tulemus võis tuleneda ka asjaolust, et graanulite puhul on kandjaks kasutatav pind palju väiksem ning samuti võis tulemust mõjutada ka graanulite immobiliseerimisega tekkinud komplikatsioonid, mis võisid kandjat kahjustada.



Joonis 9. Nailon6,6 graanulitele immobiliseeritud  $\alpha$ -amülaasi inaktiveerumine. Graanuleid hoiustati  $4^{\circ}\text{C}$  juures ja toatemperatuuril 0,1M fosfaatpuhvril ( $\text{pH}=7$ ).

Kui võrrelda  $\alpha$ -amülaasi inaktivatsiooni sama meetodi abil nailon6,6 niidile immobiliseeritud diamiini oksüdaasi stabiilsusega, siis  $\alpha$ -amülaas inaktiveerus oluliselt kiiremini. Immobiliseeritud diamiini oksüdaasi poolestusajaks oli üle 400 päeva, kuid  $\alpha$ -amülaas kaotas poole oma aktiivsusest juba 6 päevaga [37]. Selle üks põhjusi võib olla asjaolu, et osa ensüümi ei olnud kandjale seotud kovalentselt.

Seetõttu uuriti lisaks  $\alpha$ -amülaasi inaktivatsioonile ajas ka ensüümi seondumist kandjale. Selleks kasutati aktiveeritud niiti tärglase hüdrolüüsiks järjest 10 korral (joonis 10).



Joonis 10. Nailon6,6 niidi inaktiveerumine ühe päeva jooksul sõltuvalt selle kasutamisest tärglisse hüdrolüüsiks. Mõõtmised viidi läbi 0,1M fosfaatpuhvris (pH=7) ja lainepikkusel 580nm.

Selgus, et kümne järjestikuse kasutamise käigus vähenes ensüümi aktiivsus ligikaudu 50%, samas juhul, kui päevas viidi läbi vaid üks mõõtmine, vähenes niidi aktiivsus vaid 16% (joonis 8). Seega võib öelda, et suur osa niidile jäänud ensüümist ei olnud kovalentselt seondunud.

## Kokkuvõte

Käesolevas töös uuriti kartulitärklise modifitseerimiseks kasutatava  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks kasutatavat meetodikat ning selle ensüümi immobiliseerimist erinevatele nailon6,6 kandjatele.

Esmalt määrati optimaalsed tingimused  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramiseks. Leiti, et need olid lahuse pH=7,0, inkubeerimisaeg 2% tärklise lahusega 60 minutit 60 °C juures.

Ensüümi aktiivsus määrati hüdrolüüsimate tärklise ja joodi vahelisel reaktsioonil moodustuva kompleksi neelduvuse mõõtmisel lainepikkusel 580nm. Optimeeritud meetodit kasutati nii lahustunud kui ka immobiliseeritud ensüümi aktiivsuse hindamisel. Leiti, et kommertsiaalses preparaadis oli  $\alpha$ -amülaasi aktiivsus  $0,17 \pm 0,03$  U/ml ( $0,61 \pm 0,03$  U/mg valgu kohta).

Ensüüm immobiliseeriti nailon6,6 niidile ja graanulitele, kasutades dimetüülsulfaati ja glutaaraldehüüdi. Kandjaid iseloomustati nende eripinnaga, mis niidi ja graanulite jaoks oli vastavalt  $0,5760 \text{ m}^2/\text{g}$  ja  $0,00702 \text{ m}^2/\text{g}$ . Nailon6,6 niidile immobiliseeritud ensüümi aktiivsus oli  $0,55 \pm 0,02$  U/mg ning graanulite puhul  $0,0048 \pm 0,002$  U/mg. Selline tulemus on põhjustatud nailon6,6 niidi suuremast eripinnast.

Ensüümi inaktiveerumist nailon6,6 niidil uuriti 47 päeva jooksul ja nailon6,6 graanulite inaktiveerumist 23 päeva jooksul 4°C juures ja toatemperatuuril.

Immobiliseeritud ensüümi stabiilsuse uurimisel selgus, et niidile immobiliseeritud ensüümi poolestusaeg 4°C juures oli  $5,965 \pm 0,003$  päeva. Graanulitele immobiliseeritud ensüümi poolestusaeg samal temperatuuril oli  $4,248 \pm 0,005$  päeva.

Ensüümi seondumisstabiilsuse uurimisel selgus, et 10 korra kasutamise järel vähenes niidi aktiivsus 50%. Seega võib öelda, et suur osa niidile jäänud ensüümist ei olnud kovalentselt seondunud ning edaspidises uurimistöös oleks vaja immobiliseerimise tingimusi optimeerida.

## Kasutatud kirjandus

- [1] M. J.E.C. van der Maarel, B. van der Veen, J. C.M. Uitdehaag , H. Leemhuis, L. Dijkhuizen. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*. **2002**, 94, 137-155.
- [2] S. C. Zeeman, J. Kossmann, A. M. Smith. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. **2010**, 61, 209-234.
- [3] B. C. Murray, D. H. Gross, T. J. Fox. Starch Manufacturing: A Profile. *Research Triangle Institute*. **1994**, 8-9.
- [4] J. Singh, L. Kaur, N. Singh. Effect of Acetylation on Some Properties of Corn and Potato Starches. *Starch/Stärke*. **2004**, 56, 586-601.
- [5] R. P. Ellis, M. P. Cochrane, M. Finlay, B. Dale, C. M. Duffus, A. Lynn, I. M. Morrison, R. D. M. Prentice, J. S. Swanson, S. A. Tiller. Starch Production and Industrial Use. *J Sci Food Agric*. **1998**, 77, 289-311.
- [6] J. M. Fang, P. A. Fowler, J. Tomkinson, C. A. S. Hill. The Preparation and characterisation of series of chemically modified potato starches. *Carbohydrate Polymers*. **2002**, 47, 245-252.
- [7] Starch dextrinization. For structural changes.  
<http://www.andritz.com/se-downloads-starch-dextrinization.pdf> viimati külastatud 27.04.2016.
- [8] J. Singh, L. Kaur, O. J. McCarthy. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications - A review. *Food Hydrocolloids*. **2007**, 21, 1–22.
- [9] Thai Tapioca Starch Association. Modified Starch (2011)  
<http://www.thaitapiocastarch.org/article25.asp> viimati külastatud 03.03.2016.
- [10] R. Hoover. Acid-Treated Starches. *Food Rev. Int*. **2000** 16(3), 369–392.
- [11] L. S. Matsuguma, L. G. Lacerda, E. Schnitzler, M. A. S. C. Filho, C. M. L. Franco, I. M. Demiate. Characterization of Native and Oxidized Starches of Two Varieties of Peruvian



Carrot (*Arracacia xanthorrhiza*, B.) From Two Production Areas of Paraná State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **2009**, 52, 701-713.

[12] E. M. Ochubiojo, A. Rodrigues. From Food to Medicine. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. **2012**, 355-380.

[13] Y. Xu, V. Miladinov, M. A. Hanna. Synthesis and Characterization of Starch Acetates with High Substitution. *Cereal Chem.* **2004**, 81(6), 753-760.

[14] R. Hui, C. Qi-he, F. Ming-liang, X. Qiong, H. Guo-qing. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food Chemistry*. **2009**, 114, 81–86.

[15] XinChang GuoBang Import And Export Co., Ltd. [http://www.xcgbie.com/pro\\_detail/id/42.html](http://www.xcgbie.com/pro_detail/id/42.html) viimati külastatud 13.05.2016.

[16] C. Chiu, D. Solarek. *Modification of Starches. Starch: Chemistry and Technology*, 3rd ed.; Elsevier, US, **2009**, 629-655.

[17] O. B. Wurzburg, C. D. Szymanski. Modified Starches for the Food Industry. *J. Agr. Food Chem.* **1970**, 18(6), 997-1001.

[18] International Starch Institute. Food Additives (Modified Starches) in the European Union. <http://www.starch.dk/isi/applic/E-numbers.htm> viimati külastatud 05.05.2016.

[19] M. Miyazakia, P. van Hunga, T. Maedad, N. Moritaa. Recent advances in application of modified starches for breadmaking. *Trends in Food Science & Technology*. **2006**, 17, 591-599.

[20] A. Hajibabaei, F. Abdolmaleki, S. A. Y. Ardakani. Influence of potato and corn modified starches as fat replacers on sensory and physicochemical properties of milk. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. **2014**, 3-7, 830-834.

[21] A. K. Mishra. *Modified Starches for Enhanced Paper Quality and Higher Productivity*. [http://www.tappsa.co.za/archive2/Journal\\_papers/Modified\\_starches/modified\\_starches.html](http://www.tappsa.co.za/archive2/Journal_papers/Modified_starches/modified_starches.html) viimati külastatud 29.04.2016.

[22] A. Jonhed. Properties of modified starches and their use in the surfake treatment of paper. *Faculty of Technology and Science Chemical Engineering*. Karlstad University Studies, **2006**.

- [23] M. C. Sweedman, M. J. Tizzotti, C. Schafer, R. G. Gilbert. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*. **2013**, 19, 905-920.
- [24] J. Shaw, F. Lin, S. Chen, H. Chen. Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **1995**, 36, 195-200.
- [25] K. Worthington, V. Worthington. Worthington Enzyme Manual. *Worthington Biochemical Corporation*. <http://www.worthington-biochem.com/aa/> viimati külastatud 10.04.2016.
- [26] Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem*. **2007**, 362(1), 154.
- [27] K. Reimand. *Amülaas meditsiinis*.  
<http://www.kliinikum.ee/yhendlabor/images/stories/kasiraamat/A/amlaas.pdf> viimati külastatud 06.04.2016.
- [28] *Bacillus Licheniformis* alpha-amylase.  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BLI> viimati külastatud 23.03.2016.
- [29] A. Sundarram, T. Pandurangappa, K. Murthy.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. **2014**, Vol. 2, No. 4, 166-175.
- [30] T. Yuuki, T. Nomura, H. Tezuka, A. Tsuboi, H. Yamagata, N. Tsukagoshi, S. Udaka. Complete Nucleotide Sequence of a Gene Coding for Heat and pH-Stable  $\alpha$ -Amylase of *Bacillus licheniformis*: Comparison of the Amino Acid Sequences of Three Bacterial Liquefying  $\alpha$ -Amylases Deduced from the DNA Sequences. *J. Biochem.* **1985**, 98, 1147-1156.
- [31] K. J. Wanderley, F. A. G. Torres, L. M. P. Moraes, C. J. Ulhoa. Biochemical characterization of  $\alpha$ -Amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*. **2004**, 231, 165-169.
- [32] L. Campos, C.R. Felix. Purification and Characterization of glucoamylase from *Humicola grisea*. *Applied and Environmental Microbiology*. **1995**, June, 2436-2438.

- [33] Y. R. Abdel-Fattah, N. A. Soliman, N. M. El-Toukhy, H. El-Gendi, R. S. Ahmed. Production, Purification, and Characterization of Thermostable  $\alpha$ -Amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. *Journal of Chemistry*. **2013**, volume 2013.
- [34] T. Krishnan, A. K. Chandra. Purification and Characterization of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*. **1983**, Aug, 430-437.
- [35] C. Hatanaka, Y. Kobara. Determination of Glucose by a Modification of Somogyi-Nelson Method. *Agric. Bioi. Chem.* **1980**, 44(12), 2943-2949.
- [36] N. Nelson. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method For the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* **1944**, 153, 375-380.
- [37] K. Kivirand, T. Rincken. Preparation and Characterization of Cadaverine Sensitive Nylon Threads. *Sensors Letters*. **2009**, Vol. 7, 1-6.
- [38] N. Goyal, J.K. Gupta, S.K. Soni. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus*. Sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Technology*. **2005**, 37, 723-734.
- [39] M.Yaldagard, S. A. Mortazavi, F. Tabatabaie. Effect of Ultrasonic Power on the Activity of Barley's Alpha-amylase from Post-sowing Treatments of Seeds. *World Applied Sciences Journal*. **2008**, 3(1), 91-95.
- [40] M. K. Goel. Immobilized Enzymes. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/carrier.htm> viimati külastatud 13.05.2016.
- [41] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*. **2013**, 3, 1–9.
- [42] A. A. Khan, M. A. Alzohairy. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Research Journal of Biological Sciences*. **2010**, 5 (8), 565-575.
- [43] Technical Data Sheet for fungal alpha amylase. <http://www.murphyandson.co.uk/datasheets/Data-Sheets2/Fungal%20Alpha%20Amylase.pdf> viimati külastatud 18.05.2016.

[44] Product data sheet for fungal alpha amylase.  
<http://www.vatangida.net/uploads/Products/fbba2d2bd6304dbdb1117ec8d0bf7f47.pdf> viimati  
külastatud 18.05.2016.

[45] T. Rinken, J. Järv, A. Rinken. Production of Biosensors with Exchangable Enzyme-Containing Threads. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 6042-6044.

## Summary

### Detection of $\alpha$ -amylase activity and its immobilization for the production of modified starch.

In Estonia, the production of potato was 128 thousand tons in 2013. Despite of this, starch and modified starch are not produced and modified starch is imported in large amounts from abroad.

One method for the modification of potato starch is enzyme catalyzed hydrolysis. Usually the enzymes are added in soluble form to the starch and therefore they remain in final product as there is no way to remove them. To reduce the cost of starch modification, a good option is the immobilization of enzymes onto some solid carrier, to enable their multiple use.

The aim of the current work was to find the optimal conditions for measuring of the activity of  $\alpha$ -amylase, accomplish the immobilization of  $\alpha$ -amylase on different nylon6,6 carriers and study the activity and stability of the immobilized enzyme.

First, the optimal conditions for the detection of the activity of  $\alpha$ -amylase were determined. We found that the optimum conditions are pH=7,0, incubation time 60 minutes in 2% starch solution at 60°C.

The activity assessment was based on the formation of blue starch-iodine complex, which adsorption was measured at 580nm. The method was used for the detection of the activity of both the soluble and immobilized  $\alpha$ -amylase.

The activity of soluble  $\alpha$ -amylase in the used commercial preparation was  $0,17 \pm 0,03$  U/ml ( $0,61 \pm 0,03$  U/mg protein).

Enzyme was immobilized onto nylon6,6 threads and granules, using dimethyl sulfate and glutaraldehyde. The activity of the immobilized  $\alpha$ -amylase on threads was  $0,55 \pm 0,02$  U/mg and  $0,0048 \pm 0,0024$  U/mg on granules.

The inactivation of  $\alpha$ -amylase immobilized onto nylon6,6 threads was examined during 47 days and on granules during 23 days at room temperature and at 4°C. The inactivation half-time values for threads were  $5,965 \pm 0,003$  days and for granules  $4,248 \pm 0,005$  days at 4°C.

The attachment of  $\alpha$ -amylase on nylon6,6 carriers was examined by using thread with immobilized enzyme 10 times successively. This caused the decrease of enzyme activity for 50%, so almost half of the initial activity of the immobilized enzyme was caused by non-covalent bound enzyme. For the application of immobilized  $\alpha$ -amylase for production of modified starch, the conditions of  $\alpha$ -amylase immobilization should be optimized in the future to gain maximal economic effect.

## **Infoleht**

### **Tärklise modifitseerimisel kasutatava $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramine ning immobiliseerimine.**

$\alpha$ -amülaas on ensüüm, mida kasutatakse modifitseeritud tärklise tootmisel. Käesolevas töös leiti  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramise tingimused, mis põhinesid sinise tärklis-jood kompleksi tekkimisel. Meetodit kasutati nii lahustunud kui immobiliseeritud ensüümi aktiivsuse määramiseks. Ensüüm immobiliseeriti nailon6,6 niidile ja graanulitele, kasutades dimetüülsulfaati ja glutaaraldehüüdi. Niidile immobiliseeritud ensüümi aktiivsus oli  $0,55 \pm 0,02$  U/mg ning graanulitel  $0,0048 \pm 0,0024$  U/mg. Ensüümi inaktiveerumise poolestusaeg oli 4°C juures niidil  $5,9654 \pm 0,003$  päeva ja graanulitel  $4,248 \pm 0,005$  päeva.

**Märksõnad:** modifitseeritud tärklis,  $\alpha$ -amülaas, aktiivsus, ensüümi immobiliseerimine.

### **Detection of $\alpha$ -amylase activity and its immobilization for the production of modified starch.**

$\alpha$ -amylase is an enzyme used in the production of modified starch. In current work, the conditions for measuring the activity of  $\alpha$ -amylase were determined and optimized. The activity was measured based on formation of blue starch-iodine complex. This method was used for determination of the activity of both soluble and immobilized enzyme. Enzyme was immobilized onto nylon6,6 threads and granules, using dimethyl sulfate and glutaraldehyde. The activity of the immobilization on thread  $\alpha$ -amylase was  $0,55 \pm 0,02$  U/mg and on granules  $0,0048 \pm 0,0024$  U/mg. The inactivation half-time of enzyme on threads and granules at 4°C was  $5,9654 \pm 0,003$  and  $4,248 \pm 0,005$  days accordingly

**Keywords:** modified starch,  $\alpha$ -amylase, activity, enzyme immobilization.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Greta Pentsa,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Tärglise modifitseerimisel kasutatava  $\alpha$ -amülaasi aktiivsuse määramine ning immobiliseerimine“,

mille juhendaja on Toonika Rinken,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 02.06.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2016